

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1932

THÈSE

N°

350

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Edouard Yves DESHAYES

Né le 14 avril 1907 à Mur-de-Bretagne (Côtes-du-Nord)

LE

SÉRUM ANTITÉTANIQUE

SA PRODUCTION

Président : M. RATHERY, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

—
1932

300

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1932

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Edouard Yves DESHAYES

Né le 14 avril 1907 à Mur-de-Bretagne (Côtes-du-Nord)

LE

SÉRUM ANTITÉTANIQUE

SA PRODUCTION

Président : M. RATHERY, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1932

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie	ROUVIERE.
Anatomie médicale-chirurgicale et chirurgie expérimentale	GRÉGOIRE.
Physiologie	BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie générale	DESGREZ.
Bactériologie	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	CLERC.
Pathologie chirurgicale	LENORMANT.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et Médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.	M. VILLARET.
Clinique médicale.	CARNOT.
	BEZANÇON.
	ACHARD.
	Marcel LABBÉ
Hygiène et clinique de la première enfance.	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux.	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	TEISSIER.
	DELBET.
Clinique chirurgicale.	CUNÉO.
	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	LEGUEU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale.	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	Léon BERNARD
Professeurs sans chaire.	MAUCLAIRE et
	MULON.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

ALAJOUANINE Neurologie et Psychiatrie.
 AUBERTIN . . Pathologie médicale.
 BÉNARD (Hen-
 ri Pathologie médicale.
 BROCC Pathologie chirurgicale.
 BRULÉ Pathologie médicale.
 BUSQUET . . Pharmacologie.
 CADENAT . . Pathologie chirurgicale.
 CATHALA . . Pathologie médicale.
 CHABROL . . Pathologie médicale.
 CHAILLEY-BERT . . Physiologie.
 CHEVALLIER . Pathologie médicale.
 DOGNON . . . Physique.
 DONZELOT . . Pathologie médicale.
 ECALLE . . . Obstétrique.
 FEY Urologie.
 GASTINEL . . Bactériologie.
 GATELLIER . Pathologie chirurgicale.
 De GAUDART D'ALLAINES Pathologie chirurgicale.
 GIROUD . . . Histologie.
 HARVIER . . Pathologie médicale.
 HAZARD . . . Pharmacologie.
 HOVELACQUE Anatomie.
 HUGUENIN . . Anatomie pathologique.
 HUTINEL . . Pathologie médicale.
 JOANNON . . Hygiène.

MM.

LABBÉ (Henri). Chimie biologique.
 LAROCHE (Guy) Pathologie médicale.
 LEVEUF . . . Pathologie chirurgicale.
 LEVY-VALENSI. Neurologie et psychiatrie.
 LIAN Pathologie médicale.
 N Histologie.
 MONDOR . . . Pathologie chirurgicale
 MOREAU . . . Pathologie médicale.
 MOULONGUET . . Pathologie chirurgicale.
 MOURE Pathologie chirurgicale
 N Histologie.
 OBERLING . . Anatomie pathologique.
 OLIVIER . . . Anatomie.
 PIEDELIEVRE Médecine légale.
 PORTES . . . Obstétrique.
 QUENU . . . Pathologie chirurgicale.
 RICHET Fils . Physiologie.
 SANNIÉ . . . Chimie biologique.
 SÉZARY . . . Dermatologie et syphili-
 graphie.
 VALLÉRY-RA-
 DOT (Pasteur). Pathologie médicale.
 VAUDESCAL . Obstétrique.
 VELTER . . . Ophtalmologie.
 VERNE Histologie.
 VIGNES . . . Obstétrique.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.

GUÉNIOT Obstétrique.
 LEQUEUX Obstétrique.
 LEROUX Anatomie patholo-
 gique.

MM.

NEVEU-LEMAIRE Parasitologie.
 REPTERER . . Histologie.
 ZIMMERN . . Physiologie.

IV. — AGREGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE

à titre permanent

MM.		MM.	
ABRAMI	Clinique médicale.	MATHIEU. . . .	Clinique chirurgicale
CHIRAY.	Clinique médicale.	MOCQUOT	Clinique chirurgicale.
DEBRE	Clinique médicale.	PROUST	Clinique chirurgicale.
DUVOIR.	Clinique médicale.	SCHWARTZ. . . .	Clinique chirurgicale.
BASSET.	Clinique chirurgicale.	LE LORIER	Clinique obstétricale.
CHEVASSU. . . .	Clinique chirurgicale.	LEVY-SOLAL. . . .	Clinique obstétricale.
HEITZ-BOYER	Clinique chirurgicale.	METZGER.	Clinique obstétricale.

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. MAUCLAIRE, professeur sans chaire.	}	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du tra- vail, les mutilés de guerre et les infirmes adultes.
FREY		Stomatologie.
CHAILLEY-BERT, agrégé. . .		Éducation physique.
LEDOUX-LEBARD		Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ		Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions mises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

*Témoignage de ma reconnaissance
infinie et de ma profonde affec-
tion.*

A MES FRÈRES

A TOUS MES PARENTS

A MES AMIS D'ÉTUDES ET DE RÉGIMENT

ANDRÉ MAUGER, les Docteurs TAILLARD, VÉRON
BOSCHER, LAURENT
le chirurgien dentiste LINTANF

A MES VIEUX AMIS DE VACANCES

Monsieur GUILLET et ALAIN GUILLO

A TOUS MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. le Professeur RATHERY

Professeur de clinique thérapeutique médicale
Médecin des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

*Nous le remercions du grand hon-
neur qu'il nous fait en acceptant
la présidence de cette thèse ; nous
l'assurons de notre profonde gra-
titude.*

A M. G. RAMON

Directeur de l'Annexe de l'Institut Pasteur de Garches

*Qui nous a inspiré notre thèse et
nous a toujours accueilli avec
une grande bienveillance. Hom-
mage de respectueuse reconnais-
sance.*

A MON COUSIN EDOUARD LÉMETAYER

Sous-directeur de l'Annexe de l'Institut Pasteur
de Garches

*Qui nous a tant aidé dans l'accom-
plissement de ce travail. Qu'il
veuille bien trouver ici l'expres-
sion de toute notre reconnais-
sance.*

A TOUS MES MAITRES DE L'ECOLE DE MÉDECINE
DE RENNES

INTRODUCTION

Aussi loin que l'on puisse remonter dans l'histoire de la médecine, on trouve décrits les symptômes du tétanos ; sa symptomatologie si dramatique et ses effets si funestes en firent une des maladies dont les chercheurs s'attachèrent le plus à découvrir la pathogénie.

Les doctrines les plus diverses sont émises pour interpréter les accidents.

Ce n'est qu'en 1884 que Carle et Rattone réussissent l'inoculation expérimentale en injectant au lapin une émulsion faite avec les tissus d'une plaie, recueillis sur le cadavre d'un homme mort du tétanos.

La même année, Nicolaïer obtient des résultats analogues par l'insertion sous-cutanée de terre végétale : le pus de l'abcès ainsi formé, réinoculé, détermine le tétanos ; ce pus renferme à côté de formes banales multiples « un bacille anaérobie ayant la forme de bâtonnets grêles, dont une extrémité présente un renflement bien coloré et plus tard une spore qui ne se colore que faiblement ».

En 1889, Kitasato fait connaître une méthode permettant d'isoler le bacille et de le cultiver à l'état de

pureté. Un an plus tard, Kund Falar établit le rôle de la toxine tétanique dans la production des accidents ; il les provoque par inoculation de la culture filtrée.

Dès que la pathogénie du tétanos fut établie de façon expérimentale, les savants s'attachèrent à rechercher des méthodes d'immunisation contre la toxine tétanique.

METHODES ANCIENNES

En décembre 1890, Behring et Kitasato font connaître le premier procédé d'immunisation contre le tétanos ; ils rendent le lapin réfractaire à cette maladie en lui injectant sous la peau une culture virulente de bacille tétanique et aussitôt après 3 cc., d'une solution de trichlorure d'iode à 1 % ; cette injection de la solution iodée est renouvelée pendant les quatre jours suivants, à des intervalles de 24 heures ; au bout de quinze à vingt-cinq jours, les lapins ainsi traités supportent 2 à 3 cc. de culture virulente en ne présentant qu'un tétanos local et résistent ensuite à l'inoculation de 5 cc. d'un bouillon très virulent.

Ces savants établissent les propositions suivantes :

1° Le sang d'un lapin rendu réfractaire au tétanos est capable de détruire les toxines du tétanos ;

2° Cette propriété peut se démontrer pour le sang extrait des vaisseaux et pour le sérum qui en provient débarrassé de toutes cellules ;

3° Cette propriété est si durable qu'elle persiste même après la transfusion dans l'organisme d'autres animaux elle permet ainsi un traitement de l'affection ;

4° Cette propriété manque dans le sang d'animaux non réfractaires et le poison tétanique peut se retrouver après leur mort dans le sang et les autres humeurs.

Cette méthode en outre d'une mortalité de 60 % ne confère l'immunité que pour deux mois, mais il faut reconnaître avec Vaillard qu'on doit de la reconnaissance à ces savants dont les recherches sur les deux maladies toxiques par excellence, le tétanos et la diphtérie, ont abouti à une découverte aussi mémorable qui a orienté la science vers les propriétés acquises par le sérum des animaux immunisés et fondé la sérothérapie.

Dans le compte rendu des séances de l'Académie des Sciences du 21 février et du 6 juin 1891, Vaillard expose une méthode qui utilise les propriétés vaccinales présentées par les cultures filtrées du microbe, partiellement dépourvues de leur pouvoir toxique par le chauffage.

« A trois jours d'intervalle, on injecte dans une veine de l'oreille deux doses de 10 cc. d'une culture filtrée, chauffée pendant une heure à 60° ; cinq jours après, on injecte 10 cc. de la même culture, chauffée une heure à 55° ; cinq jours après, injection d'une même quantité chauffée une heure à 50° ; cela suffit pour donner l'immunité aux animaux et conférer au sang la propriété antitoxique. L'état réfractaire est renforcé au moyen de cultures filtrées douées de toute leur toxicité ; tous les 8 ou 10 jours, on en injecte dans les veines des doses croissantes, 5, 10, 20, 30 cc., on obtient ainsi une immunité durable ; les animaux vaccinés sont réfractaires au tétanos et pendant huit mois, leur sérum a conservé un pouvoir antitoxique important ».

La même année, Tizzoni et Mme Cattani vaccinent le chien par l'inoculation de petites doses de culture ou de toxine, additionnées d'eau chlorée ou d'acide phénique à 5 % : toute une série d'observations de tétanos humain guéri grâce à l'antitoxine préparée par ces auteurs fut publiée en Italie ; ces observations sont sujettes à caution car elles ne mentionnent pas les cas mortels et s'appliquent uniquement à des cas de tétanos atténué.

Au Congrès de Londres, en 1891, Roux mentionne un procédé plus simple et plus rapide que Vaillard fait connaître en 1892. La toxine est additionnée préalablement d'iode, qui à faible dose, modifie instantanément le poison tétanique. Roux et Vaillard vaccinent ainsi le cobaye, le lapin, le rat en leur injectant d'abord des mélanges extemporanés de toxine tétanique et de liqueur de Gramm, puis des doses progressivement croissantes de toxine pure.

Ces savants, avec Nocard, immunisent alors par le même procédé, des animaux de grande taille capables de fournir assez de sérum pour permettre d'entreprendre le traitement à l'homme.

Dans l'histoire de la préparation des différents sérums thérapeutiques, on retrouve pour chacun d'eux, des hésitations lorsqu'on dût faire choix des sujets producteurs. Les petits animaux de laboratoire, cobayes, rats, souris, ou s'immunisent mal, ou sont difficiles à saigner et fournissent une trop faible quantité de sérum.

Dans le domaine expérimental, on s'est adressé surtout au lapin ou à des animaux de taille moyenne, de prix abordable, tels que le chien, le mouton, la chèvre ou le porc ; mais

lorsqu'on est passé à la pratique de la sérothérapie, c'est à des animaux de grande taille, chevaux ou bovidés, qu'on a dû recourir pour avoir un rendement de sérum suffisant.

Lorsque le sérum est destiné à la thérapeutique humaine, on s'adresse généralement aux bovidés ou au cheval, ou même presque exclusivement au cheval ; dans certains pays, en Allemagne par exemple, on a conseillé pour éviter les accidents sériques chez les sujets sensibilisés antérieurement au sérum de cheval, d'employer le sérum des bovidés ; cette double préparation des sérum thérapeutiques, sur le cheval et sur le bœuf, est, en pratique, difficilement réalisable.

Il a été prouvé qu'au point de vue toxicité naturelle du sérum, le mieux supporté par l'homme et le plus facilement résorbé par ses tissus est celui de cheval. En outre, les équidés sont, en général, dociles et faciles à manier, ils réagissent assez régulièrement, sans exagération ; il est aisé de les saigner en raison de la situation très superficielle de leurs jugulaires.

Les chevaux ne devront être ni trop jeunes, ni trop âgés : trop jeunes, leur résistance aux infections est encore relativement précaire et on peut redouter qu'ils soient atteints, en cours de préparation, de lésions inflammatoires des synoviales qui obligent à interrompre prématurément l'immunisation ; trop âgés, il faut compter avec la débilité sénile et une carrière de producteur abrégée.

On écartera les chevaux de couleur claire souvent porteurs de tumeurs mélaniques, ceux qui ont tendance à présenter des engorgements chroniques des membres, indice de leur faible aptitude à résorber les œdèmes ou les épanchements. Il faut également compter avec la réaction individuelle de l'animal : tel cheval qui réagit bien à un antigène donné, n'est qu'un médiocre producteur d'anticorps, s'il reçoit un autre antigène.

L'étude de l'action thérapeutique du sérum marcha naturellement de pair avec celle des procédés d'hyper-immunisation des animaux.

En août 1892, Kitasato montre que les animaux qui reçoivent le sérum avant la toxine ou aussitôt après sont préservés, mais le tétanos survient toujours quand le sérum est injecté dans les 12 ou 24 heures qui suivent l'injection.

Nocard fait connaître que, chez le cheval, une dose de 20 cc. de sérum injectée 24 et même 48 heures après l'inoculation d'une dose mortelle de toxine suffit à le préserver contre la toxi-infection tétanique ; la marge laissée à l'action préventive du sérum était donc plus étendue que pour les petits animaux de laboratoire. Il en déduit ce fait que, dans la pratique, on pourrait éviter l'apparition du tétanos ou enrayer l'évolution de cette affection en intervenant, même plusieurs jours après le traumatisme, sous la réserve que plus l'intervention est tardive, plus la dose de sérum injectée doit être considérable ; à la fin de 1894, Nocard incite les praticiens à injecter systématiquement 10 cc. de sérum le plus tôt possible après le traumatisme.

En 1895, le même auteur publie les résultats obtenus en chirurgie vétérinaire ; sa communication incite les médecins à suivre la même voie.

Dès ce moment, quelques chirurgiens comme Guinard appliquèrent systématiquement le sérum dans les cas de plaies suspectes ; en 1896, Bazy porte la question devant la Société de Chirurgie : ayant observé quatre cas de tétanos au cours d'une seule année dans son service

de Bicêtre, Bazy résolut d'appliquer l'injection préventive de 10 cc. de sérum à tous les traumatismes avec plaies, dès lors il n'observa plus de tétanos. La méthode parut rationnelle et devint bientôt d'un usage très répandu dans les grands services chirurgicaux en France et à l'étranger.

Au Congrès de Chirurgie en 1902, Vallas concluait : « Un fait indubitable se dégage, c'est la prévention possible de cette terrible maladie, la sérothérapie préventive possède une action certaine, le traitement préventif est formellement indiqué dès qu'on se trouve en présence d'une plaie suspecte, l'abstention en pareil cas est une faute ».

La généralisation de la sérothérapie antitétanique devait inciter les savants à tenter de perfectionner les méthodes de production du sérum.

En 1909, Lowenstein modifie le procédé de Roux et Vaillard en remplaçant la liqueur de Gramm par le formol ; avec cette toxine formolée, il immunise des animaux de laboratoire et commence l'hyperimmunisation des sujets producteurs de sérum antitétanique

En 1915, Martin, Frasey et Salimbini immunisent le cheval avec des toxines chauffées suivant un procédé analogue à celui employé par Vaillard en 1891.

La même année, Lowenstein, par analogie aux travaux des Américains sur la diphtérie, réalise l'immunisation contre le tétanos, soit par l'injection de mélanges de toxine et d'antitoxine, soit par injections successives, à intervalle de quelques heures, d'antitoxine d'abord, de toxine ensuite.

En réalité, c'est la méthode de Roux et de Vaillard, qui, pendant de longues années, fut employée dans nombre d'instituts de sérologie.

A titre d'exemple, afin de comparer ce procédé aux méthodes actuelles, nous donnons ci-dessous, un des protocoles suivis pour cette hyperimmunisation. On utilise une bonne toxine, c'est-à-dire une toxine tuant la souris au 1/4000 de cc. Le mélange avec la liqueur de Gramm se fait au moment où on doit l'utiliser.

1 ^{re} inject.	1 cc. du mélange	2/3 de liq. de Gramm	1/3 de toxine
2 ^e —	2 cc. —	2/3 —	1/3 —
3 ^e —	3 cc. —	2/3 —	1/3 —
4 ^e —	5 cc. —	2/3 —	1/3 —
5 ^e —	7 cc. —	2/3 —	1/3 —
6 ^e —	10 cc. —	2/3 —	1/3 —
7 ^e —	15 cc. —	2/3 —	1/3 —
8 ^e —	1 cc. du mélange	1/2 de liq. de Gramm	1/2 de toxine
9 ^e —	2 cc. —	1/2 —	1/2 —
10 ^e —	3 cc. —	1/2 —	1/2 —
11 ^e —	5 cc. —	1/2 —	1/2 —
12 ^e —	10 cc. —	1/2 —	1/2 —
13 ^e —	15 cc. —	1/2 —	1/2 —
14 ^e —	20 cc. —	1/2 —	1/2 —
15 ^e —	1 cc. du mélange	1/3 de liq. de Gramm	2/3 de toxine
16 ^e —	2 cc. —	1/3 —	2/3 —
17 ^e —	5 cc. —	1/3 —	2/3 —
18 ^e —	10 cc. —	1/3 —	2/3 —
19 ^e —	15 cc. —	1/3 —	2/3 —
20 ^e —	20 cc. —	1/3 —	2/3 —
21 ^e inject.	1 cc. du mélange	1/4 de liq. de Gramm	3/4 de toxine
22 ^e —	2 cc. —	1/4 —	3/4 —
23 ^e —	5 cc. —	1/4 —	3/4 —
24 ^e —	10 cc. —	1/4 —	3/4 —
25 ^e —	15 cc. —	1/4 —	3/4 —
26 ^e —	20 cc. —	1/4 —	3/4 —
27 ^e —	25 cc. —	1/4 —	3/4 —
28 ^e —	30 cc. —	1/4 —	3/4 —

29°	—	40 cc.	—	1/4	—	3/4	—
30°	—	1 cc. du mélange	1/10 de liq. de Gramm	9/10 de toxine			
31°	—	2 cc.	—	1/10	—	9/10	—
32°	—	5 cc.	—	1/10	—	9/10	—
33°	—	10 cc.	—	1/10	—	9/10	—
34°	—	15 cc.	—	1/10	—	9/10	—
35°	—	20 cc.	—	1/10	—	9/10	—
36°	—	25 cc.	—	1/10	—	9/10	—
37°	—	30 cc.	—	1/10	—	9/10	—
38°	—	40 cc.	—	1/10	—	9/10	—
39°	—	40 cc.	—	1/10	—	9/10	—
40°	—	2 cc. du mélange	1/20 de liq. de Gramm	19/20 de toxine			
41°	—	4 cc.	—	1/20	—	19/20	—
42°	—	8 cc.	—	1/20	—	19/20	—
43°	—	12 cc.	—	1/20	—	19/20	—
44°	—	20 cc.	—	1/20	—	19/20	—
45°	—	30 cc.	—	1/20	—	19/20	—
46°	—	40 cc.	—	1/20	—	19/20	—
47°	—	50 cc.	—	1/20	—	19/20	—
48°	—	1/10 cc. toxine pure					
49°	—	1/2 cc.	—				
50°	—	1 cc.	—				
51°	—	2 cc.	—				
52°	—	4 cc.	—				
53°	—	6 cc.	—				
54°	—	10 cc.	—				
55°	—	15 cc.	—				
56°	—	20 cc.	—				
57° inject.	—	25 cc.	—				
58°	—	30 cc.	—				
59°	—	40 cc.	—				
60°	—	60 cc.	—				
61°	—	100 cc.	—				
62°	—	150 cc.	—				
63°	—	200 cc.	—				
64°	—	250 cc.	—				

L'immunisation peut être complète vers le troisième mois, mais il faut la continuer au delà de ce terme pour obtenir un sérum qui possède le maximum de son

pouvoir antitoxique. L'immunité doit ensuite être entretenue par des injections mensuelles de 250 cc. à 400 cc. de toxine. Les saignées ont lieu dix jours après la dernière injection de rechargement du cheval.

La méthode dite américaine — injection d'antitoxine suivie tous les deux jours d'injection de toxine diluée à doses progressivement croissantes — comporte les mêmes inconvénients d'incertitude quant au pouvoir antigène et de risques pour les producteurs.

MÉTHODES ACTUELLES

Tous les procédés pratiques de production de sérum antitétanique que nous avons passés en revue, outre l'inconvénient d'une longue préparation de l'animal, déterminaient souvent chez celui-ci des accidents dus à la difficulté du dosage et à l'instabilité de la toxine. Il faut, avec ces procédés, opérer par tâtonnements, aussi ce sont des méthodes empiriques qui ménagent des effets insuffisants, désagréables et inattendus.

A. — Flocculation

Le premier grand pas accompli, et la base des progrès réalisés dans la préparation du sérum datent de la découverte de la flocculation dans les mélanges de toxine et de sérum antitoxique correspondant (Ramon), phénomène étudié antérieurement sur le venin de cobra par Danysz, puis par Calmette, Césari et Ramon.

Les toxines possèdent la propriété de se combiner avec leur antitoxine qui est l'anticorps spécifique leur correspondant rigoureusement et ne correspondant qu'à elles. Elles réalisent alors des complexes toxiques

atténués ou même complètement inoffensifs ; ces complexes, lorsqu'ils sont en proportion convenable, possèdent cette propriété spéciale : ils floclent et cette flocculation se fait comme l'a montré Ramon, dans de telles conditions qu'il est possible d'inférer de son taux au pouvoir vaccinant ou immunisant de la toxine.

Se basant sur ce fait que si la toxicité est une propriété fragile et instable, la propriété antigénique se montre relativement stable, Ramon applique la réaction de flocculation qui lui permet d'apprécier, de doser aussi exactement que possible, le pouvoir antigène de la toxine tétanique.

Pour effectuer cette réaction, écrit Ramon, « il faut tout d'abord choisir un sérum antitétanique étalon, nous disons choisir, car pour des raisons qui nous échappent encore — différence de composition chimique ou mieux de constitution physique — certains sérums antitétaniques donnent, en présence de la toxine tétanique une réaction de flocculation anormale dans son aspect et pas toujours en rapport avec le titre antitoxique déterminé *in vivo*.

Depuis trois ans, nous utilisons un sérum fourni par un même cheval et dont le pouvoir flocculant, à chaque saignée mensuelle, a toujours été en rapport étroit avec sa contenance en antitoxine telle que l'indique le dosage chez l'animal ; de plus le mélange de ce sérum et de toxine tétanique dans lequel apparaît la flocculation initiale s'est toujours montré neutre vis-à-vis du cobaye. Ceci posé, voici comment nous opérons : soit par exemple, à apprécier et à chiffrer la valeur antigène d'une

toxine tétanique. Préparons un certain nombre de tubes à hémolyse contenant chacun 4 cc. de cette toxine ; ajoutons dans ces tubes, sous forme de dilutions de notre sérum étalon des quantités progressivement décroissantes d'unités antitoxiques 20-16-12-6-4, etc., etc. ; après avoir agité pour bien mélanger, plaçons les tubes à l'étuve à 38° ; en examinant de temps en temps ces tubes, nous remarquerons que le contenu de quelques-uns d'entre eux devient de plus en plus opalescent.

Au bout d'un temps variable, nous constaterons que l'un des mélanges, par exemple celui renfermant 12 unités antitoxiques floccule ; il a donc fallu 12 unités pour faire apparaître la floculation dans 4 cc. de toxine ; nous dirons que cette toxine a une valeur de 3 unités antigéniques au centimètre cube.

A cet élément fondamental d'appréciation de la valeur antigène, qui peut être appelé taux de floculation, s'en ajoute un autre, celui de la vitesse de floculation qui, quoique secondaire, a aussi son importance, et l'on peut dire que de deux toxines exigeant pour flocculer la même quantité d'unités antitoxiques (provenant d'un même sérum antitoxique étalon) celle qui flocculera le plus rapidement aura le meilleur pouvoir antigène.

La découverte de la floculation dans les mélanges de toxine et d'antitoxine spécifique, fut rapidement suivie de celle non moins importante des anatoxines qui permet, comme nous le verrons, d'améliorer les méthodes de production des sérums antidiphthérique et antitétanique.

B. — Les anatoxines

Au cours de ses recherches sur l'anatoxine diphtérique, Ramon incita son collaborateur Descombey à étudier l'anatoxine tétanique et lui fit entrevoir l'utilisation de cette anatoxine dans l'immunisation active des animaux contre le tétanos. Descombey déclare qu'il ne saurait mieux faire, pour définir l'anatoxine tétanique, que d'appliquer à son cas particulier la définition générale des anatoxines, telle que l'a donnée Ramon en 1924.

« L'anatoxine tétanique est un produit qui a perdu toute la nocivité de la toxine tétanique dont il dérive, mais qui en possède encore toute la valeur floculante et en a conservé également toutes les propriétés immunisantes. »

a) Préparation.

Plusieurs procédés, comme l'ont montré Ramon et Berthelot, permettent d'obtenir l'anatoxine tétanique. C'est ainsi que ces auteurs ont utilisé avec plus ou moins de succès des aldéhydes éthyliques, la chaleur seule, la bile, etc... Le procédé le plus pratique pour préparer l'anatoxine tétanique consiste à additionner la toxine de 2 centimètres cubes d'aldéhyde formique à 40 0/0 par litre de toxine ; le mélange est ensuite placé à l'étuve à 40° pendant un mois.

La quantité de formol à ajouter à la toxine varie avec la qualité du formol. Sous l'influence de l'action combinée du formol et de la chaleur, la toxine tétanique est transformée en un produit nouveau, l'anatoxine tétanique.

b) Pouvoir antigène.

Si, comme nous le verrons plus loin, le pouvoir toxique de la toxine tétanique soumise à l'action simultanée du formol et de la chaleur a totalement disparu, le pouvoir antigène de ce produit nouveau persiste. C'est ce que permet de constater aisément la réaction de floculation de Ramon, donnant la valeur antigène exprimée en unités antigéniques. Si nous examinons le pouvoir floculant de la toxine formolée au cours de son séjour à l'étuve et jusqu'à sa transformation en anatoxine, nous constatons que le taux de floculation reste invariable ; par contre le temps nécessaire à la manifestation du phénomène de floculation est d'autant plus long que la toxine a séjourné davantage à l'étuve et que la proportion de formol est plus élevée. Or, Ramon a montré que la lenteur excessive de la réaction de floculation caractérise les antigènes de qualité inférieure, et ceci, comme l'a montré Descombey sur le cobaye, s'applique parfaitement à l'anatoxine tétanique dont le pouvoir antigène est également en raison inverse du temps de floculation.

Le mode de préparation donné plus haut représente les conditions optima d'une bonne vitesse de floculation, partant, d'une bonne valeur antigène.

c) Inocuité.

La toxicité de la toxine formolée et mise à l'étuve subit, dès les premiers jours, un abaissement rapide et manifeste. C'est ainsi, comme l'a montré Ramon, qu'une toxine tétanique, tuant en quatre à cinq jours, le cobaye

de 300 grammes à la dose de 0,00⁰¹, une fois formolée ne donne même plus après 48 heures de séjour à l'étuve, de tétanos local au cobaye à la dose de 0 cc. 005, la dose mortelle minima n'étant plus alors que de 0 cc. 01. Après cinq ou six jours d'étuve, l'injection aux cobayes de la dose énorme de 5 centimètres cubes est incapable de provoquer le moindre accident local de tétanos, mais donne néanmoins au bout de 4 à 5 jours un tétanos généralisé mortel, accident à rapprocher de ceux observés après l'injection de mélange toxine sérum incomplètement neutralisé. Au bout de vingt jours environ, l'injection sous cutanée de 10 centimètres cubes au cobaye est devenue tout à fait inoffensive; la toxine a été transformée en un produit caractérisé par l'absence absolue de toxicité. Descombey a pu injecter d'emblée 800 centimètres cubes d'anatoxine tétanique à un cheval neuf sans aucun inconvénient pour le sujet et il est vraisemblable, ajoute-t-il, que cette dose aurait pu être dépassée. Poursuivant l'étude de l'inocuité absolue de l'anatoxine tétanique, Descombey a également montré que l'emploi de l'anatoxine n'a aucune influence sur les spores tétaniques dont l'organisme peut être porteur et d'autre part, que les injections intracérébrales répétées d'anatoxine, n'ont jamais provoqué chez le cobaye aucun accident d'anaphylaxie.

d) Activité immunisante.

Si l'anatoxine tétanique, telle qu'elle a été décrite par Ramon et Descombey, est un produit atoxique, elle a conservé néanmoins, comme nous l'avons vu, son pou-

voir antigène titrable par la floculation ; ce pouvoir antigène peut être également mis en évidence *in vivo*.

Un centimètre cube de l'anatoxine tétanique, préparée comme il a été indiqué, injecté sous la peau à des cobayes, rend ceux-ci capables de résister au bout de deux à trois semaines, à une injection intra-musculaire d'une dose de toxine tétanique plusieurs fois mortelle pour les témoins. Pour bien montrer la valeur antigène de l'anatoxine tétanique, il n'est pas inutile de rappeler que d'après Okuda, il faut 1 à 3 centimètres cubes de toxine iodée pour créer, chez le cobaye, une immunité lui permettant de résister à une dose mortelle seulement.

Descombey a confirmé sur le cobaye, ce que Ramon avait établi pour les anatoxines en général, à savoir que le pouvoir antigène d'une anatoxine est en raison inverse du temps de floculation ; celui-ci peut donc bien servir à apprécier le pouvoir antigène de l'anatoxine tétanique, le taux de floculation restant l'élément principal d'appréciation. Ce pouvoir antigène persiste pendant des mois, que l'anatoxine soit conservée à la glacière ou à la température de laboratoire.

L'anatoxine tétanique est donc bien un produit nouveau, ce n'est pas, ainsi que le croient certains auteurs une toxine rendue inoffensive par l'addition de formol ou par tout autre moyen — depuis longtemps déjà, comme nous l'avons vu, on sait détruire la toxicité de la toxine tétanique — ; on peut lui appliquer ce que Ramon disait de l'anatoxine diphtérique. « L'anatoxine ne présenterait qu'un progrès relatif dans la préparation des antigènes, n'apporterait aucune contribution

nouvelle à la pratique de l'immunisation antitoxique, si elle n'était qu'un bouillon diphtérique dont la toxicité a été plus ou moins abolie. »

L'anatoxine tétanique est bien un produit nettement différencié de la toxine dont elle dérive ; elle est atoxique, elle conserve son pouvoir antigène titrable par la floculation, elle se montre très stable dans son inocuité et son pouvoir immunisant, elle offre une résistance particulière à la chaleur puisqu'elle peut être chauffée jusqu'à 55°, 56° pendant une heure sans rien perdre de ses qualités.

En 1924, Descombey, poursuivant l'étude du pouvoir antigène, montre que des cobayes qui reçoivent une injection sous-cutanée de 0,1 centimètre cube d'anatoxine tétanique, acquièrent une immunité qui leur permet, 60 jours après la vaccination, de résister sans tétanos local à l'épreuve de 10 doses mortelles de toxine (dont l'activité est contrôlée sur des témoins). Ramon et Laffaille, à la même époque, publient le résultat de leurs recherches sur l'immunisation antitétanique des animaux de laboratoire ; de l'ensemble des résultats acquis, ces trois auteurs concluent que « l'immunité antitétanique active peut être obtenue facilement chez les petits animaux de laboratoire, soit par une ou mieux deux injections d'anatoxine (faites par exemple à vingt jours d'intervalle) soit encore par l'injection d'une dose d'anatoxine pratiquée quelque temps après des injections simultanées de sérum antitétanique et d'anatoxine. »

Descombey poursuit ses recherches sur l'immunisation des animaux de laboratoire et met en évidence quelques points d'une importance capitale qui l'amèneront vite à tenter l'immunisation au cheval. A propos de l'influence de la dose d'antigène il établit que le cobaye produit d'autant plus d'antitoxine qu'il a reçu d'avantage d'anatoxine et que l'immunité est d'autant plus considérable que les humeurs sont plus riches en antitoxine, ce qui montre ajoute-t-il, que l'antitoxine paraît bien être la raison de l'immunité du cobaye contre le tétanos.

Il établit d'autre part que cette immunité du cobaye, encore nulle dix jours après une injection d'anatoxine, devient très appréciable après deux semaines pour s'accroître ensuite avec le temps d'une façon formidable comme le montrent les résultats enregistrés par cet auteur. Des cobayes ayant reçu 1 centimètre cube d'anatoxine résistent à quelques doses mortelles au bout de deux semaines, à 50 et 100 doses au bout de trois semaines et à 500 ou 1000 doses mortelles après un mois, parfois plusieurs milliers de doses au bout de deux ou trois mois.

Cette influence inattendue et remarquable du temps écoulé depuis la vaccination sera heureusement mise à profit dans la vaccination du cheval.

Si une seule dose d'anatoxine permet d'obtenir chez le cobaye une immunité remarquable, deux doses d'anatoxine donnent des résultats meilleurs encore ; Ramon a en effet établi en 1924, qu'au point de vue de l'immunité antitoxique conférée, deux doses d'antigène, même faibles injectées à intervalles de temps très longs valent mieux que plusieurs doses plus fortes injectées à intervalles rapprochés.

Partant de ce principe, Descombey montre que chez le cobaye il faut ménager entre deux injections d'anatoxine un intervalle de temps assez long, pas moins de quinze jours et si possible trois semaines, un mois et plus encore ; la quantité absolue d'anatoxine injectée a son importance, mais

elle s'efface devant l'influence de la répétition des injections et de leur espacement, point qui va être avantageusement appliqué dans l'immunisation active du cheval.

Ramon et Descombey établissent qu'une première dose d'anatoxine de 10 centimètres cubes ne provoque chez le cheval, même au bout de quelques semaines, qu'une immunité minime, souvent à peine décelable. Les résultats ne sont guère meilleurs si on augmente la dose d'antigène, la portant à 20, 50, 100 centimètres cubes et plus ; Descombey a cependant obtenu une immunité suffisante au moyen d'une seule injection d'anatoxine à dose élevée, 200, 400, 800 centimètres cubes, au bout de 20, 18 et 13 jours ; elle n'est pas supérieure à celle que l'on peut obtenir au moyen de deux injections de 10 et 20 centimètres cubes d'anatoxine. La nécessité d'une telle quantité d'antigène pour la vaccination au moyen d'une seule injection est donc pratiquement irréalisable.

Mais si une seule injection aux doses pratiques ne confère qu'une immunité insignifiante, sous l'influence de cette première injection d'anatoxine, l'organisme animal acquiert une aptitude spéciale à répondre ultérieurement à une deuxième injection par la production d'une immunité d'autant plus rapide dans son apparition et d'autant plus élevée dans sa valeur que l'intervalle du temps entre les deux injections aura été plus grand.

Notons que ce résultat, comme nous l'avons vu à propos des essais de vaccination sur le cobaye, avait déjà été enregistré par Ramon dans ses recherches sur la vaccination antidiptérique et semble obéir à une loi générale sur l'immunité antitoxique et aussi, dans certains cas, de l'immunité microbienne.

De leurs nombreux essais, Ramon et Descombey conclurent que « deux injections d'antigène, même à faible

dose, faites à intervalle de temps très long, valent mieux, au point de vue de l'immunité, que plusieurs doses plus fortes répétées à intervalles rapprochés. »

Descombey constate en outre que la voie d'introduction la plus favorable est la sous-cutanée et conclut que l'immunité est en relation étroite avec la résorption lente de l'antigène.

Afin de bien mettre en relief la valeur immunisante de l'anatoxine tétanique, Descombey l'a comparée à différents autres antigènes, il montre par des essais concluants l'infériorité manifeste des toxines chauffées chez lesquelles un reste de toxicité loin de renforcer le pouvoir antigène, semble constituer une entrave à une bonne immunisation, et des toxines iodées (Vaillard-Okuda) nécessitant un nombre d'injections assez élevé et ne développant qu'une faible immunité.

D'autre part, Lowenstein et Eissler ont signalé l'impossibilité de vacciner le cobaye au moyen d'une seule injection toxine et antitoxine, quelle que soit la proportion des éléments du mélange. Ramon et Laffaille ont montré, chez le lapin, qu'une injection d'un mélange d'anatoxine et d'antitoxine ne confère pas l'immunité.

Au cours d'une longue série d'expériences, Descombey montre que la vaccination par l'anatoxine tétanique entraîne chez le cheval l'apparition dans les humeurs d'antitoxine qu'il titre sur le cobaye.

Ramon, peu de temps après la découverte des anatoxines utilise l'anatoxine tétanique dans l'hyperimmu-

nisation des chevaux producteurs de sérum antitétanique.

L'anatoxine, antigène atoxique et particulièrement stable dont le titre peut être facilement dosé par la floculation est, au début des essais, injectée à doses progressivement croissantes (10 injections environ) ; ceci permet alors sans aucun risque, l'inoculation de toxine pure à raison de 10 cc. pour la première dose, pour atteindre 400 cc. à la neuvième ou dixième dose. Le protocole reste encore long (une vingtaine d'injections en quatre mois et demi environ) mais les risques pour les animaux sont considérablement réduits.

Les sérums ainsi obtenus ont une valeur antitoxique au moins égale à celle des sérums préparés par la méthode de la toxine iodée.

Cette technique initiale devait vite être améliorée.

Addition à l'antigène d'une substance non spécifique

Ramon, au cours des titrages des sérums antidiphtériques, remarque que le titre de certains de ces sérums présente brusquement un accroissement d'une saignée à l'autre. Cherchant à s'en expliquer les raisons, il constate, à plusieurs reprises, que ces sérums proviennent de chevaux ayant présenté de volumineux abcès ou œdèmes à la suite des dernières injections d'antigène, et il attribue cette hausse brusque du titre des sérums aux phénomènes inflammatoires enregistrés ; il fut ainsi conduit à provoquer les mêmes phénomènes.

Après avoir essayé diverses substances, il donna rapidement la préférence à la poudre de tapioca qui provoque localement un fort œdème avec afflux leucocytaire.

Presqu'en même temps, Ramon et Descombey, poursuivant de front les études sur un moyen de production plus intensive des antitoxines diphtérique et tétanique, publient :

« Nous avons cherché à appliquer à l'immunisation antitétanique du cheval et à la préparation de l'antitoxine tétanique le procédé que l'un de nous vient de mettre en évidence pour la production de l'antitoxine diphtérique. Ce procédé consiste à provoquer par l'injection sous-cutanée d'un mélange de l'antigène (anatoxine ou toxine) et de poudre de tapioca, une réaction locale avec œdème plus ou moins marqué, afflux leucocytaire, résorption lente de cet antigène, etc... »

Dans un premier essai, trois chevaux reçoivent, à un mois d'intervalle, deux injections de 10 cc. d'anatoxine tétanique à laquelle on a ajouté un peu de tapioca finement pulvérisé et soigneusement stérilisé ; douze jours après la seconde injection, 1 cc. de leur sérum neutralise en moyenne 2000 doses mortelles (pour le cobaye), alors que le sérum des trois autres chevaux ayant reçu aux mêmes dates les mêmes doses de la même anatoxine, mais sans tapioca, neutralise à peine 300 doses mortelles.

Au cours d'une seconde expérience, cinq chevaux reçoivent successivement 5, 10, 20, 35, 50 et 100 cc. d'anatoxine tétanique à quatre jours d'intervalle ; cinq autres sont injectés avec les mêmes doses d'anatoxine au tapioca : 1 cc. du sérum de ces derniers neutralise, en moyenne, plus de 10.000 doses mortelles, par contre celui des cinq premiers

est à peine capable de neutraliser 200 doses mortelles.

Enfin, dans un dernier essai, une série de vingt-huit chevaux qui ont déjà reçu de nombreuses injections d'antigène (anatoxine puis toxine) est scindée en deux lots ; aux animaux du premier lot, on continue à injecter de la toxine, à ceux du second, on injecte de la toxine à laquelle on a ajouté au préalable du tapioca ; après avoir pratiqué ainsi trois injections, on saigne les chevaux et on titre leur sérum. La teneur moyenne des sérums en antitoxine ne dépasse pas 1500 unités pour les chevaux du premier lot, alors qu'elle est supérieure à 3000 pour ceux du deuxième lot qui avaient reçu la toxine au tapioca. Ce procédé permettra d'écourter sensiblement la période d'hyperimmunisation toujours longue.

Ces résultats corroboraient les idées de Ramon et Descombey. « Nous nous étions souvent demandé s'il n'y avait pas de relation entre la lenteur de l'hyperimmunisation antitétanique et l'absence presque totale de réaction locale à l'endroit de l'injection de l'antigène ; nous avons été amenés à admettre, après quelques essais, que cette absence de toute réaction locale favoriserait l'élimination et la perte d'une grande partie de l'antigène, ceci d'autant plus que l'injection intraveineuse donne lieu à une immunité plus lente encore à se manifester. Les résultats des essais rapportés qui confirment l'importance de la réaction locale ici provoquée (quelle que soit l'interprétation que l'on puisse donner à son rôle) apportent un nouvel appui à notre manière de voir ».

A vrai dire, l'idée de ces précipités insolubles n'était pas de date récente, puisque dès 1889, Roux et Yersin

cherchaient à réaliser l'immunité antidiphtérique chez l'animal d'expérience, au moyen de précipités obtenus en faisant agir sur la toxine diphtérique qu'ils viennent de découvrir, le chlorure de calcium par exemple. « Si la matière toxique, écrivent-ils, adhérerait assez au corps insoluble, elle ne diffuserait que lentement et ainsi se produirait peut être l'accoutumance graduelle de l'animal ».

A la suite des résultats acquis par Ramon et Descombey, divers expérimentateurs ont essayé d'obtenir le même effet avec d'autres substances que le tapioca, en utilisant par exemple un sel tel que l'alun de potasse, capable de produire un précipité plus ou moins insoluble lorsqu'il est ajouté à l'antigène (Glenny et ses collaborateurs).

Ramon fit à cette époque des recherches sur l'action d'antigènes microbiens non spécifiques et sur le pouvoir antigène non spécifique de ces produits (alun-tapioca). Ses conclusions furent que : « en l'absence d'antigène spécifique, non seulement le pouvoir antitoxique du sérum ne s'est pas élevé, mais au contraire, a légèrement baissé ». Les résultats observés après des injections de pilocarpine permirent d'arriver aux mêmes résultats, l'augmentation du pouvoir antitoxique du sérum étant dans ce cas en rapport avec la diminution des humeurs du cheval, étant seulement fonction de la plus grande concentration. Ramon concluait : « Ce n'est pas de son propre fonds exclusivement que l'organisme peut tirer tous les matériaux qui lui sont nécessaires pour la préparation de l'antitoxine ; il doit éga-

lement faire appel, pour cette préparation, à d'autres éléments d'origine extrinsèque. Ces éléments ne peuvent lui être fournis que par l'antigène spécifique dont la réinjection est absolument indispensable pour qu'il y ait production nouvelle d'antitoxine ».

Mais si des modifications heureuses sont ainsi apportées progressivement quant à la nature de l'antigène, des perfectionnements sont parallèlement enregistrés quant au protocole proprement dit de l'hyperimmunisation.

Peu à peu, le nombre des injections, la quantité totale d'antigène ainsi que la durée de l'hyperimmunisation ont pu être réduits.

Utilisation des chevaux antérieurement vaccinés

Comme nous l'avons déjà exposé, Ramon et Descombey ont insisté sur ce point que deux doses d'antigène même faibles injectées à intervalle de temps très long valent mieux au point de vue de l'immunité qu'elles confèrent que plusieurs doses plus fortes répétées à intervalles rapprochés.

Partant de ces données, confirmées sur des centaines de chevaux, ces auteurs ont été amenés à modifier les techniques utilisées jusqu'alors dans la production de l'antitoxine tétanique. Ils ont soumis à l'hyperimmunisation antitétanique suivant un des derniers protocoles que nous avons donnés plusieurs chevaux ayant reçu auparavant deux injections d'anatoxine tétanique, ils ont pu remarquer chez ces sujets une aptitude re-

marquable à tirer parti de l'antigène spécifique et ces chevaux sont devenus beaucoup plus capables que des chevaux neufs de produire de l'antitoxine tétanique. C'est ce que montre avec une évidente netteté l'essai comparatif suivant :

Le 23 mai 1929, on met 12 chevaux en hyperimmunisation antitétanique ; six d'entre eux sont des chevaux neufs, les six autres sont d'anciens producteurs d'antitoxine diphtérique antérieurement vaccinés contre le tétanos. Tous reçoivent, à intervalles de cinq jours les doses suivantes d'antigène :

1° Anatoxine et tapioca : 50-75-100-150-200-250 cc.

Puis 2° toxine et tapioca 200-250-300-350-450-550 cc.

A la première saignée, faite 65 jours seulement après le début de la période d'hyperimmunisation, le titrage de leur sérum fournit les résultats suivants :

Chevaux neufs			Chevaux antérieurement vaccinés		
N ^{os} 139.....	500	unités	N ^{os} 145.....	1600	unités
140.....	600	—	146.....	1600	—
141.....	600	—	147.....	1400	—
142.....	600	—	148.....	1600	—
143.....	600	—	149.....	1200	—
144.....	600	—	150.....	2400	—

Ramon et Lemétayer ont cherché à tirer parti à la fois de cette propriété et de l'accroissement de l'antitoxine tétanique sous l'influence de l'addition à l'antigène spécifique d'une substance telle que la poudre de tapioca, par exemple.

Quinze chevaux vaccinés contre le tétanos fin 1929 reçoivent, du 30 octobre 1930 au 4 décembre, successivement et

à cinq ou six jours d'intervalle 10-30 100 cc. d'anatoxine puis 200-250 350 et 450 cc. de toxine tétanique.

Chacune de ces doses, sauf la dernière, est additionnée avant l'injection de tapioca pulvérisé et stérilisé à raison de 1 gr. pour 100 cc. d'antigène. L'hyperimmunisation dure, dans ces conditions 35 jours et la quantité totale d'antigène injecté est de 1500 cc. à peine.

La première saignée est faite huit jours après la dernière injection. Le dosage de l'antitoxine tétanique dans les sérums ainsi recueillis a fourni les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous :

N ^{os}	1.....	6.000 unités
	2.....	1.200 —
	3.....	3.000 —
	4.....	1.800 —
	5.....	10.000 —
	6.....	2.600 —
	7.....	6.000 —
	8.....	6.500 —
	9.....	1.800 —
	10.....	2.800 —
	11.....	6.000 —
	12.....	3.000 —
	13.....	6.000 —
	14.....	10 000 —
	15.....	600 —

Le titre antitoxique moyen pour ces quinze sérums est donc de 4800 unités internationales.

En regard de ces résultats, plaçons par exemple ceux acquis en 1924, dans des conditions voisines, mais avec des méthodes toutes différentes.

Vingt chevaux neufs, non vaccinés, puisque le procédé de vaccination par l'anatoxine n'était pas encore

employé, ont été soumis durant plus de quatre mois, à l'hyperimmunisation au moyen de doses croissantes de toxine additionnée de liqueur iodo-iodurée d'abord, puis de toxine pure, représentant au total plus de trois litres d'antigène. Sur les vingt sérums fournis par ces animaux aussitôt après la période d'hyperimmunisation, deux titraient 350 unités internationales, un titrait 120 unités, trois titraient 40 unités, quatorze titraient moins de 40 unités, soit un titre moyen de moins de 100 unités.

Citons encore, à titre comparatif, les résultats obtenus et publiés récemment par des expérimentateurs qui ont cependant tenu compte, dans une certaine mesure, des principes précédents. La valeur antitoxique moyenne des sérums préparés par Schmidt atteint en 1927-28 près de 1000 unités internationales et la valeur la plus élevée obtenue chez un cheval est de 4.400 unités.

Condrea, en utilisant diverses techniques — antigènes très actifs — prépare des sérums dont le titre antitoxique moyen est de 600 unités, et cela après un temps d'hyperimmunisation beaucoup plus long et des quantités d'antigène plus considérables.

Glenny, dans un article publié en 1930, dit avoir atteint des moyennes de 1600 unités.

La mise en parallèle de tous ces chiffres et résultats obtenus par ces différents auteurs, avec ceux fournis par Ramon et Lemétayer dans l'essai ci-dessus rapporté, donne la mesure des progrès réalisés à tous points de vue, grâce aux méthodes que Ramon a établies et per-

fectionnées durant ces six dernières années et que les auteurs ont associées dans cet essai.

Essais personnels

Au cours de cette étude, nous avons parlé à plusieurs reprises des résultats bien supérieurs obtenus grâce à l'addition d'une substance non spécifique, le tapioca par exemple ; la constatation au point d'injection de tuméfaction avec œdème et afflux leucocytaire nous amena à rechercher si l'augmentation du pouvoir antitoxique ne serait pas en rapport avec une hyperleucocytose généralisée. En effet, si, à l'heure actuelle, on connaît l'aptitude d'un organisme en présence d'un antigène spécifique à fournir un anticorps déterminé, on ne sait rien de l'origine de ces anticorps.

D'après Ehrlich, le poison bactérien n'est fixé que par les cellules sur lesquelles il exerce son action destructive : il appuie sa théorie sur les recherches de Wassermann et de Tokaki qui ont montré que la matière cérébrale et celle de la moelle épinière neutralisent la toxine tétanique.

Metchnikoff est d'avis que les leucocytes absorbent les toxines et présentent la cause de l'immunité naturelle contre ces dernières ; à son instigation Kobzarenko cherche à élucider le rôle des leucocytes dans la destruction des toxines : il utilise des leucocytes de cheval, vivants ou morts et montre qu'en aucun cas, les leucocytes n'absorbent la toxine tétanique, car tandis que le liquide provenant du mélange des leucocytes et de la

toxine est aussi toxique que la toxine elle-même, les leucocytes restent inoffensifs.

Récemment Soituz étudiant le mécanisme intime de l'augmentation de l'immunité sous l'influence de l'addition à l'antigène de substances non spécifiques, a pu se rendre compte que ces substances produisent toutes chez le cheval de l'hyperleucocytose. De plus, il a pu constater que la production d'antitoxine est particulièrement intense lorsque l'hyperleucocytose atteint son niveau le plus élevé ; il a recherché le degré d'hyperleucocytose provoqué par l'addition à l'antigène tétanique soit de tapioca, soit d'un sel tel que l'alun de potasse recommandé par Glenny ; l'antigène diphtérique pouvant produire par lui-même une réaction locale et une assez forte leucocytose, Soituz étudia également la leucocytose produite par cet antigène, seul ou associé à l'antigène tétanique.

Cinq lots de trois chevaux chacun sont constitués ; les animaux du premier lot sont immunisés au moyen de l'antigène tétanique. Cet antigène est additionné de 1 % de tapioca pour les animaux du deuxième lot et 2 % d'alun pour ceux du troisième lot. Les animaux du quatrième lot sont immunisés avec l'antigène diphtérique seul et ceux du cinquième lot avec le mélange des antigènes diphtérique et tétanique.

L'hyperimmunisation a été poursuivie par des injections sous-cutanées de 20, 40, 75, 120, 200, 250, 300 et 400 cc. de chaque antigène tous les sept jours (les premières doses avec de l'anatoxine, les doses suivantes avec de la toxine).

Les modifications numériques des éléments figurés du sang survenues au cours de ce traitement ont été étudiées

pour chaque animal 21 ou 48 heures après toute injection, en comptant les globules avec le compte globules de Malassez et en établissant la formule leucocytaire du sang sur des frottis colorés par la méthode panoptique.

Nous donnons dans ce tableau les chiffres moyens, par groupes d'animaux, de quelques-uns des résultats obtenus.

N ^{os} des lots	Antigène	Globules blancs	Rapport des polynucléaires aux mononucléaires	Unités antitoxiq.
Après 3 semaines de traitement : 135 cc. d'antigène inoculé 270 cc. pour le cinquième lot				
1	Anatoxine tétanique seule.....	9.500	28/1	1/2 env.
2	Anatoxine tétanique + tapioca..	18.030	5,18/1	1
3	Anatoxine tétanique + alun..	13.880	4,6/1	5
4	Anatoxine diphtérique seule..	9.917	3,3/1	—
5	Mélange anatoxines tétanique et diphtérique.....	11.430	4,4/1	30
Après 8 semaines de traitement : 1405 cc. d'antigène inoculé 2810 cc. pour le cinquième lot				
1	Toxine tétanique seule.....	9.750	4,1/1	50
2	Toxine tétanique + tapioca...	20.900	7,03/1	200
3	Toxine tétanique + alun.....	18.750	7,7/1	400
4	Anatoxine diphtérique seule..	16.960	6,2/1	—
5	Mélange anatoxine tétanique et diphtérique.....	18.900	7,6/1	1000

Dans une autre série d'expériences, quinze chevaux répartis en trois lots avaient reçu des injections progressivement croissantes d'anatoxine tétanique et ensuite de toxine tétanique additionnées l'une et l'autre, soit de 1 % de tapioca, soit de 1 % d'alun, soit de 1 % de Ca Cl². La numération des globules blancs, sept jours après la dernière injection de 450 cc. donne les moyennes indiquées dans ce tableau ;

N ^{os} des lots		Globules blancs	Unités antitoxiques
1	Antigène tétanique + tapioca...	17.240	5.200
2	Antigène tétanique + alun.....	14 890	4.900
3	Antigène tétanique + CaCl ²	14.850	4.600

Il résulte de nos essais, conclut Soituz, que la production de l'antitoxine tétanique est beaucoup augmentée par l'addition à l'antigène d'une substance capable de produire en même temps une forte leucocytose ; l'hyperleucocytose provoquée a toujours été une polynucléose. Nos expériences ont comporté un nombre trop restreint d'animaux pour qu'on puisse affirmer que la production de l'antitoxine marche de pair avec l'hyperleucocytose provoquée au cours de l'hyperimmunisation ; il semble toutefois, d'après les résultats obtenus, que la production d'antitoxine est particulièrement intense lorsque l'hyperleucocytose tend à atteindre son niveau le plus élevé.

Nous avons repris ces essais sur des bases quelque peu différentes. Deux lots de trois chevaux chacun vaccinés contre le tétanos fin 1929, ont été constitués et soumis à l'hyperimmunisation antitétanique. L'antigène est injecté sous la peau tous les cinq ou sept jours, à raison de 20, 50, 100, 200 cc., d'anatoxine tétanique, puis de 250, 350, 450 cc de toxine tétanique ; l'anatoxine comme la toxine est additionnée de 1 % de tapioca pulvérisé et stérilisé, en ce qui concerne les animaux du premier lot (n^{os} 491, 501, 502), ceux du deuxième lot (n^{os} 513, 517, 518) recevant de l'antigène seul. La période d'hyperimmunisation a duré 32 jours seulement.

Des saignées d'essai pour le titrage des sérums et des prises de sang pour la numération globulaire sont effectuées pour chaque sujet, autant que possible à la même heure, en dehors des périodes de digestion, et la plupart du temps sur des sujets à jeun.

Pour un cheval donné, la courbe leucocytaire obtenue présente un maximum entre deux injections.

Ce maximum a été atteint par certains sujets dès le lendemain de l'injection, pour d'autres au bout de deux et même trois jours ; ce sont presque toujours les mêmes sujets qui réalisent rapidement le maximum d'hyperleucocytose, le 501 dans le premier lot, le 515 dans le deuxième.

Quelques numérations ont été effectuées deux heures après l'injection ; certains chevaux ont présenté alors un abaissement notable du taux leucocytaire par rapport à celui trouvé immédiatement avant l'injection. Cette baisse momentanée est rapidement remplacée par une hausse, le taux décroissant ensuite jusqu'à l'injection suivante ; ce sont les polynucléaires qui participent pour la plus grande part à l'accroissement leucocytaire.

La teneur en antitoxine tétanique est déterminée par le procédé habituel dans le sérum provenant des différentes saignées effectuées avant chaque injection.

Nous donnons dans le tableau ci-dessous les résultats fournis par la numération leucocytaire et le dosage d'antitoxine après la dernière injection d'anatoxine et après la dernière injection de toxine.

Antigène	N ^{os} des chevaux	Nombre de globules blancs avant l'hyperimmunisation	Après la dernière injection d'anatoxine tétanique		Après la dernière injection de toxine tétanique	
			Globules blancs maximum enregistrés	Unités antitoxiques	Globules blancs maximum enregistrés	Unités antitoxiques
Anatoxine	491	10.400	22.300	1.600	28.180	4.500
puis	501	8.660	33.000	1.400	44.180	5.000
toxine et tapioca	502	8.000	20.160	400	27.200	2.000
Anatoxine	515	11.400	13.600	200	14.420	450
puis	517	9.180	11.480	120	18.940	1.200
toxine seule	518	8.009	11.840	120	17.500	300

En examinant ce tableau, nous pouvons faire certaines constatations.

Tout d'abord, les sérums provenant des chevaux qui ont reçu l'antigène additionné de tapioca ont une teneur en antitoxine beaucoup plus élevée que ceux fournis par les chevaux injectés avec l'antigène seul.

En ce qui concerne l'hyperleucocytose provoquée, nous voyons qu'elle est très élevée chez les chevaux qui ont reçu le mélange d'antigène et de tapioca ; de plus nous constatons qu'elle est, en fin d'hyperimmunisation surtout en relation avec la teneur en antitoxine. Ainsi, par exemple, dans chaque groupe, le cheval dont le sérum présente la plus grande richesse en antitoxine est celui qui accuse le maximum d'hyperleucocytose. On est donc en droit de se demander si, comme l'avait pressenti Metchnikoff, les leucocytes ne jouent pas un rôle dans la production des antitoxines.

B. — Perfectionnements et conséquences pratiques

On sait que dans tous les instituts de sérothérapie, on réalise la prophylaxie indispensable du tétanos par

des injections périodiquement répétées de sérum antitétanique ; à cette pratique, il a été substitué celle de l'immunisation active par l'anatoxine tétanique ; tous les chevaux reçus sont soumis à l'hyperimmunisation antidiphthérique.

En même temps que la première injection d'anatoxine diphthérique, on effectue sur le côté opposé du corps, une injection de 10 cc. d'anatoxine tétanique additionnée de tapioca ; l'immunisation antidiphthérique est régulièrement poursuivie et un mois après le début de ces opérations, on injecte une deuxième dose de 10 cc. d'anatoxine tétanique au tapioca.

L'hyperimmunisation diphthérique achevée, l'on écarte systématiquement de la production du sérum antidiphthérique les chevaux qui, à la première saignée, se montrent mauvais producteurs d'antitoxine diphthérique, puis tous ceux qui par suite de la baisse progressive de leur pouvoir antitoxique, atteignent un taux insuffisant d'antitoxine diphthérique.

C'est avec des sujets préparés dans ces conditions qu'est assurée la production de l'antitoxine tétanique ; ces chevaux en effet n'ont rien perdu, ni du bénéfice des deux injections d'anatoxine tétanique qu'ils ont reçues parfois des mois auparavant, ni de leur aptitude à réagir aux injections des antigènes du bacille tétanique ; bien au contraire, par le fait même de ce traitement préalable par l'anatoxine tétanique, cette aptitude à tirer partie de l'antigène spécifique se trouve très nettement renforcée et ces chevaux sont devenus beaucoup plus capables de produire de l'antitoxine tétanique.

Ramon et Descombey firent des essais afin de savoir si d'autres vaccinations associées peuvent être utilisées chez les animaux ; utilisant un mélange d'anatoxine tétanique et de culture de streptocoques chauffé 40 minutes à 54°, 55°, ces auteurs constatent l'action favorisante exercée par ce mélange sur le développement de l'immunité antitoxique.

Les résultats de ces essais montrent que contrairement à la théorie de la « concurrence des antigènes » des auteurs allemands, un organisme est bien capable de faire les frais de deux immunisations simultanées ou successives, ce qui est d'ailleurs vérifié par Ramon et Zoeller en thérapeutique humaine : ils ont montré que chez l'homme dans la vaccination antidiphthérique, la poudre de tapioca peut être remplacée par l'anatoxine tétanique ou par un vaccin microbien, le vaccin typhoïdique par exemple.

Sérums purifiés.

L'utilisation de plus en plus importante des sérums en thérapeutique humaine, soit comme préventifs, soit à titre curatif, fit apparaître chez certains sujets sensibilisés, un ensemble de troubles réunis et connus sous le nom d'accidents sériques. Ces accidents sont la conséquence de l'introduction dans l'organisme humain par voie parentérale, des protéines sériques provenant d'un organisme d'espèce différente.

Jamais dangereux (un cas de mort sur 100.000), rarement graves, ces accidents ne doivent pas être un obstacle pour la sérothérapie ; cependant ils ne sont pas à négliger et méritent qu'on s'occupe d'eux.

Afin de les prévenir, les auteurs cherchèrent à obtenir des sérums très riches en unités antitoxiques et pauvres en matières protéiques. Comme nous l'avons vu, grâce aux perfectionnements apportés durant ces dernières années aux méthodes d'hyperimmunisation, il est possible d'obtenir aujourd'hui des sérums très riches en unités antitoxiques, ce qui permet de réduire le volume de sérum à injecter et donne par là même de grandes facilités au point de vue curatif.

Divers procédés ont été mis en œuvre pour débarrasser les sérums thérapeutiques d'une partie plus ou moins grande de leurs protéines ; certains d'entre eux, précipitation fractionnée des protéines par certains sels, osmose électrique, ultra-filtration, épuration par dessiccation et coagulation, précipitation par l'acétone et l'éther, donnent des résultats imparfaits et l'on est loin d'obtenir l'antitoxine à l'état de pureté.

Par ces méthodes, en effet, on diminuera seulement la proportion des protéines contenues dans le sérum, et il en reste encore trop quand on se place au point de vue de la prévention des accidents sériques, car on sait quelle minime quantité de substance protéique suffit pour déclancher ces accidents. Aussi, on peut se demander si tout en intervenant par les précipitations fractionnées sur la quantité des protéines sériques pour la diminuer, il ne convient pas d'agir également sur la qualité de ces protéines. N'est-ce pas d'ailleurs plutôt en leur qualité d'étrangères à l'organisme, que les protéines du sérum interviennent dans le déterminisme des accidents sériques ? C'est pourquoi, tout en isolant du

sérum la pseudo-globuline à laquelle est liée l'antitoxine, on peut chercher à effacer en elle le cachet de l'espèce qui l'a fournie. En tenant compte des principes, les uns déjà anciens, les autres nouveaux qui président chez l'animal à la production des sérums antitoxiques et en mettant en œuvre une technique que plusieurs années de mise au point ont rendue pratique et simple, on s'est efforcé de préparer des sérums antitoxiques purifiés remplissant autant que possible les conditions envisagées au début de cet exposé.

Pratiquement, l'on prépare d'abord des produits très chargés en antitoxine spécifique, de véritables solutions mères, que l'on dilue ensuite plus ou moins pour obtenir finalement le sérum purifié.

Ces sérums ont, malgré leur dilution, un pouvoir antitoxique élevé qui est d'ailleurs exactement chiffré et dosé en unités antitoxiques, de plus ils contiennent jusqu'à cinq et dix fois moins de protéines que les sérums spécifiques ordinaires à valeur antitoxique égale.

CONCLUSIONS

Cette étude permet d'affirmer la valeur de la méthode mise au point par Ramon, Descombey et Lemétayer, véritable synthèse des différents procédés tirés de leurs recherches antérieures.

Etablissons rapidement un schéma permettant de se représenter les progrès apportés par chaque amélioration nouvelle.

MÉTHODE DE VAILLARD : préparation des animaux très longue, 70 injections dans un minimum de cinq à six mois ; mortalité importante du fait des injections de toxine titrée empiriquement ; pouvoir antitoxique moyen de 100 unités.

Découverte de la floculation : mortalité moindre, la floculation permettant un titrage précis de l'antigène injecté.

Découverte des anatoxines : possibilité de vaccination rendant inoffensives les injections de toxine ; pouvoir immunisant augmenté, 400 unités ; durée d'hyperimmunisation encore longue, 4 mois et demi.

Addition à l'antigène d'une substance non spécifique : durée de l'hyperimmunisation abrégée, trois mois, pouvoir antitoxique décuplé.

Utilisation des chevaux antérieurement vaccinés : teneur du sérum très élevé en antitoxine 6000, 10.000, 15.000, un mois de préparation.

Aux avantages qui s'attachent à la mise en œuvre d'une telle méthode, économie de temps et d'antigène, absence de risques pour la vie des animaux, production d'antitoxine considérablement accrue, s'en ajoutent d'autres qui ont trait à l'utilisation des sérums antitétaniques ainsi obtenus en thérapeutique humaine.

THERAPEUTIQUE PREVENTIVE. — La vaccination antitétanique par l'anatoxine n'étant pas encore d'un usage courant, les praticiens s'en tiennent à la sérothérapie préventive ; la dose d'antitoxine tétanique généralement employée pour la prévention d'urgence du tétanos chez l'homme est de 3000 unités ; elle correspond à 1 cc. à peine des sérums dont nous venons de faire connaître la très grande valeur antitoxique ; cette très faible quantité de sérum ne renferme pour un taux d'antitoxine aussi élevé, qu'une proportion bien minime de substances protéiques qui pourra d'ailleurs être encore abaissée par la concentration et la purification, d'où réduction des accidents sériques.

THERAPEUTIQUE CURATIVE. — Ces sérums antitétaniques de haute teneur antitoxique donnent de grandes facilités pour le traitement du tétanos déclaré.

Donnons un exemple : la quantité moyenne de sérum à 3000 unités nécessaire pour le traitement d'un tétanos déclaré est de 1 litre ; avec les sérums dont nous disposons actuellement certains titrant jusqu'à 20.000 unités, le volume de liquide spécifique à injecter est ramené à 100 cc. d'où la réduction du nombre des interventions chez le malade, avantage qui n'est pas à négliger quand il s'agit du tétanos.

Vu, le Doyen,
BALTHAZARD

Vu, le Président de la thèse
RATHERY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLÉTY,

BIBLIOGRAPHIE

- BEHRING. — (*Deut. med. Woch.*, 1893).
- BRIEGER et WASSERMANN — (*Centrablt. für Bakt*, XII, 1892).
- DESCOMBEY. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1925, p. 485).
- DESCOMBEY. — (*Ann. Inst. Pasteur*, septembre 1930).
- DESCOMBEY. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, p. 239).
- DESCOMBEY. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 253 et 315).
- EHRLICH. — (*Deut. med. Woch.*, n° 38, 1898).
- GLENNY. — (*J. Path. and Biol.*, 1909).
- HAMEDY. — (*De l'aptitude des animaux à la production des antitoxines diphtérique et tétanique*, 1931).
- KITASATO. — (*Zeitsch. f. Hygiène*, juin 1891).
- KITASATO. — (*Zeitsch. f. Hygiène*, 1889).
- LE BOURDELLÉS et SÉDALLIAN. — (*Précis d'Immunologie*, 1930).
- LEMÉTAYER. — (*Rapport à la Société de pathologie comparée*, 1932).
- LEMÉTAYER et BAZY. — (*Le Tétanos*, 1931).
- LEMÉTAYER et DESHAYES. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 1473).
- METCHNIKOFF. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1898).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1922, p. 661).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1922, p. 771 et 813).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, p. 167).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1923, p. 2).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, p. 1432).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, p. 508).

- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 23).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 630).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, p. 1202).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 23).
- RAMON. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 71).
- RAMON. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1923, p. 1001).
- RAMON. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1924, p. 1).
- RAMON. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1925, p. 1).
- RAMON. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1926, p. 1).
- RAMON. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 83).
- RAMON. — (*C. R. Académie des Sciences*, 1923, p. 261).
- RAMON. — (*C. R. Académie des Sciences*, 1923, p. 1338).
- RAMON. — (*C. R. Académie des Sciences*, 1924, p. 143).
- RAMON. — (*C. R. Académie des Sciences*, 1925, p. 181).
- RAMON et DESCOMBEY. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, p. 898).
- RAMON et DESCOMBEY. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 834).
- RAMON et LEMÉTAYER. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 21, 23, 71).
- RAMON et LEMÉTAYER. — (*Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 1931).
- RAMON, LEMÉTAYER et HAMEDY. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 1228).
- RAMON et ZOELLER. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, p. 1409).
- RAMON et ZOELLER. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1927, p. 803).
- ROUX. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1894, p. 609).
- ROUX et VAILLARD. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1892-1893).
- ROUX et YERSIN. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1889, p. 284).
- SOITUZ. — (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, p. 77).
- VAILLARD. — (*Ann. Inst. Pasteur*, 1891-92-93).
- VAILLARD. — (*Sérothérapie antitétanique*, Baillière).
-

1932. Saint-Amand (Cher). — Imprimerie A. CLERC.
